

SZEMLE

A „Nitrazon“ baktériumos oltóanyag előállítása és pillangós növényeknél való alkalmazása a Csehszlovák Szocialista Köztársaságban

Csehszlovákiában a tudományos kutatómunkát a pillangós növények baktériumtrágyázásának területén STOKLASA [15, 16] és KÁŠ [11, 12] indították meg. A Második Világháború után csak 1955-ben, sok évi szünet után, kezdődött el újra a rhizobium baktérium kérdésének tanulmányozása a Prágai Központi Növénytermesztési Tudományos Kutató Intézet Mikrobiológiai Osztályán, amely módszertanilag irányítja az 1949. évben alapított baktériumoltóanyag gyárat is.

A rhizobium és a gazdanövény szimbiózisát és a szimbiózist befolyásoló különböző tényezők hatását megvilágító kutatómunka mellett igyekeztünk a „Nitrazon” baktériumos oltóanyag minőségét és gyártási technológiáját is tökéletesíteni.

Tanulmányoztuk a rhizobium baktériumok üzemi tenyésztése céljából számbajöhető különböző táptalajok használhatóságát: így a fermentációs módszert, a száraz, a pasztaszerű és az agar-agar kultúrák minőségét, meghatároztuk a poliamid és más műanyagfélések alkalmazását a „Nitrazon” csomagolására.

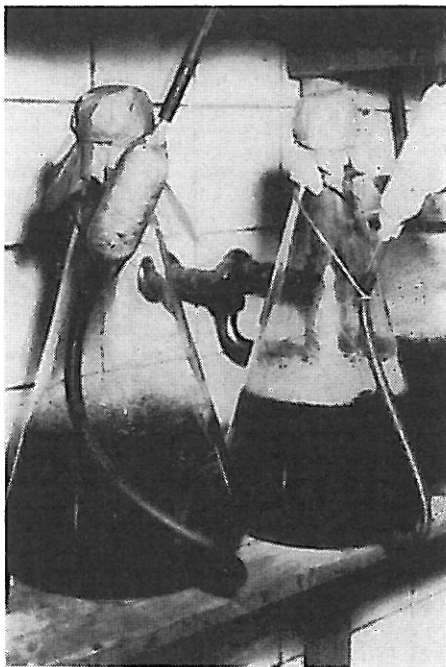
Kidolgoztuk és a termelésbe bevezettük a talaj-„Nitrazon” előállítását, rendszeresítettük a preparátum termelési fázisainak mikrobiológiai ellenőrzését és elvégeztük a 14-féle pillangós növényre specifikus üzemi rhizobium-törzs szelektálását. Mindezek mellett még meghatároztuk a különböző növények „Nitrazon”-nal történő oltásának hatékonyságát Csehszlovákia egymástól eltérő éghajlati és talajviszonyai között.

Mivel a pillangós növények számára előállított baktérium-preparátumok laboratóriumi, vagy félsteril üzemi készítési módszerét gyakran bírálják [1, 2, 10, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22], ismertetem a laboratóriumunk által kidolgozott „Nitrazon” előállítási eljárást, valamint a fentnevezett preparátum néhány sajátosságát.

Annak ellenére, hogy a rhizobium-baktériumok statikai tenyésztését már 1956-ban felcseréltük a fermentációs módszerrel, folytattuk ez utóbbi módszernek a tanulmányozását azzal a céllal, hogy kiinduló adatokat

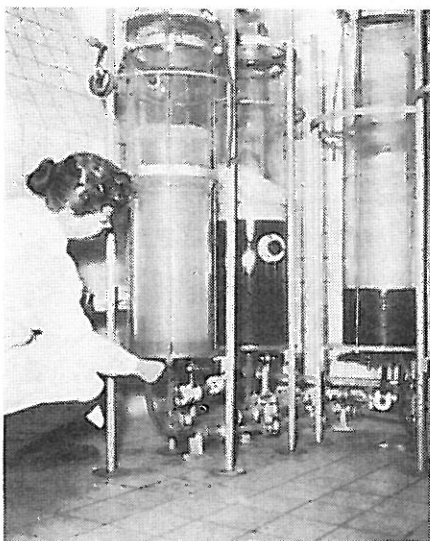
nyerjünk a preparátum tervszerű nagyüzemi előállításához. A fermentációs tenyésztési eljárás tanulmányozására szolgáló kísérletekben az alábbi fajok törzseit használtuk: *Rhizobium meliloti*, *trifolii* és *leguminosarum*. A törzsek tenyésztését 30–70 literes hasznos térfogatú üvegedényekben és félüzemi méretű 25, 65 és 300 liter űrtartalmú fermentorokban végeztük.

A tápoldatokat borsómag, vagy lucernaszéna főzetből szaharoz, glükóz és dextrin hozzáadásával készítettük (1. és 2. ábra).



1. ábra

A kiindulási rhizobium-baktérium-törzsek tenyésztése levegőárammal



2. ábra

A törzsek tenyésztése üzemi edényekben

A kiindulási törzstenyészet és a tápoldat mennyiségi aránya megközelítőleg 1 : 10. A rhizobium-baktériumok optimális tenyésztési hőmérséklete 28–30° C. Miután a folyékony táptalajt a kiinduló tenyészettel beoltottuk, célszerű néhány óráig alacsonyabb hőmérsékletet tartani, hogy megelőzzük a fertőző mikroflóra esetleges elszaporodását. A hőmérsékletet csak akkor állítjuk be optimumra, amikor már a rhizobium-baktériumok intenzíven szaporodnak. A pH a tenyésztés elején 7, később 6–7 között változhat. A levegő mennyisége, amelyet a kultúrán átengedünk, sok tényezőtől függ. A tenyésztés kezdetén elegendő gyenge levegő-zöttség, a rhizobium intenzív növekedésével erősítjük a levegő áramoltatását.

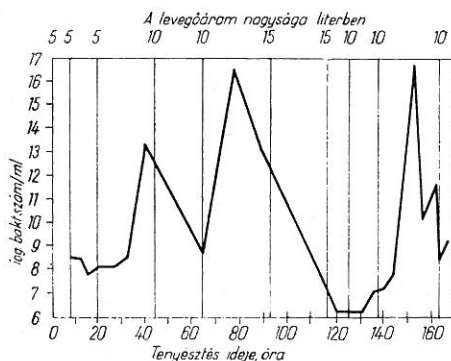
Kísérleteinkben 1 liter táptalajra számítva percnként 1 liter levegőt használtunk fel. A nagy fehérjetartalom, alacsony pH, magas hőmérséklet és intenzív levegőzöttség mellett fellépő habzást habzásgátlóval és a tenyésztési feltételek helyesbítésével küszöböljük ki. A tenyésztési időt a rhizobium-baktérium egyes növekedési fázisainak alakulása szabja meg. A tenyésztést befejezzük a baktérium lappangó növekedési fázisának elején, amikor még a kultúra a steril talajra való átvitel után is tovább szaporodik. A cukor felhasználása a tápoldatból függ az egyes rhizobiumtörzsektől és a felhasználás nem teljes. Rendszeres ellenőrzéssel feltétlenül idejében meg kell különböztetni és pontosan meghatározni a kultúra esetleges fertőzöttségét. A legtöbb fertőző mikroba ellen sikeresen alkalmaztuk kísérle-

teinkben a penicillint azoknál a rhizobium-baktériumoknál, amelyek vele szemben rezisztenseknek bizonyultak.

Különös figyelmet fordítottunk a rhizobium-baktériumok tenyésztésére, a fokozatos táptalaj adagolással működő készülékeknél és különösen a félkontinuális tenyésztési eljárásra, amikor is a kultúra egy részét kivesszük az apparatúrából és megfelelő mennyiségű steril táptalajt adagolunk hozzá (3. ábra).

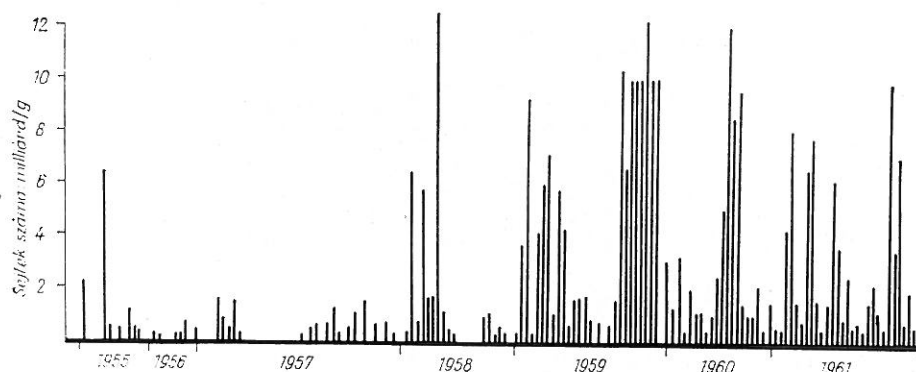
Az ilyen tenyésztés a következőképpen történik: 5 liter dextrint tartalmazó borsófőzethez 2 liter felrázott kiinduló tenyészetet adunk, majd 9 óra múlva újabb 5 liter borsófőzetet adagolunk hozzá. A közeg pH-ja 6,6–7,0. Hozzáadjuk ugyancsak a penicillint 1 milliárd sejtre számítva 40 egységnyi mennyiségben. A tenyésztés ideje alatt a kultúra egy részét kivesszük, majd egyenlő térfogatú steril táptalajjal pótoljuk. A beáramló táptalaj mennyisége és térfogata látható az ábrán. A kísérlet ideje alatt meghatároztuk a rhizobium-baktérium mennyiségét, a kultúra tisztaságát és morfológiáját. A tenyésztés 178 óráig folyik megszakítás nélkül, 7,5 nap alatt a 20 literes edényben elkészülő 95 liter kultúra esetében semmiféle fertőzést nem észleltünk.

A „Nitrazon” minőségét a régi szovjet standard alapján határoztuk meg, amely feltételezi, hogy 1 g preparátum 100 vagy 50 millió specifikus rhizobium baktérium sejtet tartalmaz. A „Nitrazon” eltarthatóságát kezdetben 6 hónapban határoztuk meg. Hamarosan bebizonyosodott azonban, hogy az áttérés a szezonjellegű termelésről a folyamatos, egész éves termelésre és a preparátum differenciált elosztása megköveteli a „Nitrazon” jóállási idejének meghosszabbítását, amit a rhizobium-baktériumok magas száma a friss preparátumban, valamint a hordozó anyag minősége is lehetővé tesz.



3. ábra

A Rhizobium meliloti tenyésztése levegő-árammal



4. ábra

A lucernára készült „Nitrazon”-készítmény rhizobium baktériumszáma az 1955–61 években. Az oszlopok a vizsgált mintákat jelentik. A vízszintes vastag vonal g-onként 100 millió baktériumot jelent

Több mint 700 db friss „Nitrazon” minta tanulmányozása megmutatta, hogy a baktériumszám a preparátumokban nem kiegyenlített, és hogy a preparátumok többségében többszörösen felülmúlja a standardot (4. ábra).

A tanulmányozott preparátumok többségénél a rhizobium-baktériumok mennyisége g-onként 500–2000 millió között mozgott és fertőzőtséget vagy egyáltalán nem, vagy jelentéktelen mértékben tapasztaltunk. Ezért 1958-ban megkezdtük a „Nitrazon” tulajdonságainak tanulmányozását 6–12 hónapos tárolás mellett. Mivel ez az időszak nem befolyásolta a „Nitrazon” minőségét, a tárolási időt 13, 24 hónap, majd 3 évre hosszabbítottuk meg.

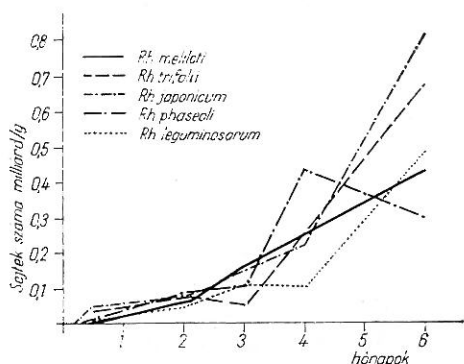
A „Nitrazon” eltarthatóságát a következő tárolási módoknál ellenőriztük:

1. Vizsgáltuk az intézetünkben 6, 9, 11, 12, 24, 30 és 35 hónapig megfelelő feltételek mellett tárolt preparátumokat és

2. a Mezőgazdasági Ellátó Vállalat üzemi viszonyai között tárolt olyan „Nitrazon” preparátumokat, amelyeknek már lejárt a jótállási határidejük.

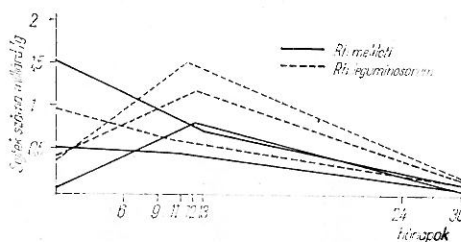
Laboratóriumunkban 6 hónapig tárolt „Nitrazon” vizsgálatánál megállapítottuk, hogy a baktériumszám *Rhizobium japonicum* esetében a 4. hónapra lecsökkent, míg a *Rhizobium meliloti* és *trifolii* esetében a 9. hónapig, emelkedő tendenciát mutat (5. ábra).

Az 500 millió/g sejttartalmú preparátumoknál a tárolási idő 11, 12 és 13 hónapra való meghosszabbítása csökkenti a baktériumszámot, míg az ennél alacsonyabb kiinduló baktériumszámmal rendelkező preparátumoknál a baktériumszám a 11.–12. hónapig növekszik és csak ezután figyelhető meg annak csökkenése (6. ábra).



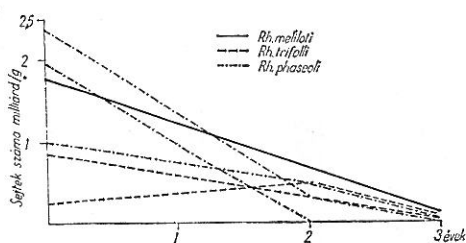
5. ábra

A 6 hónapig tárolt „Nitrazon”-készítmény rhizobium baktérium-száma. (10–10 üveg „Nitrazon”-ból nyert átlagadatok)



6. ábra

30 hónapig tárolt „Nitrazon”-készítmény rhizobium baktérium-száma (10–10 üveg „Nitrazon”-ból nyert átlag-adatok)



7. ábra

A 3 évig tárolt „Nitrazon” készítmény rhizobium baktériumszáma (10–10 üveg „Nitrazon”-ból nyert átlag-adatok)

A baktériumszám-csökkenés ellenére is a rhizobium-baktériumok száma 2,0–2,5 éves tárolás után többszörösen felülmúlta a standardot és csak 3 éves tárolás után csökkent a baktériumszám g-ként 100 millióra, vagy ennél alacsonyabbra (7. ábra).

Néhány esetben a *Rhizobium trifolii* baktériumok száma a „Nitrazon”-ban a tárolás második évében is növekedett. Infekciós mikroflóra ennél a tárolási módnál alig volt megállapítható.

A Mezőgazdasági Ellátó Vállalat üzemi viszonyai között tárolt „Nitrazon” rhizobium-baktériumok száma a minták többségében 12–35 hónapos tárolás után a standard szintjén maradt, sőt néhány esetben felülmúlta azt. A baltacim, a bab és a lucerna számára készült „Nitrazon”-ban a baktériumok száma elérte g-ként az 1–21 milliárd sejtet (8. ábra).

A „Nitrazon”-nak a Mezőgazdasági Ellátó Vállalatnál történt huzamosabb tárolásakor is majdnem minden esetben csak jelentéktelen mennyiségű fertőző mikroflóra volt megfigyelhető. A lucernával végzett szabadföldi talajol-

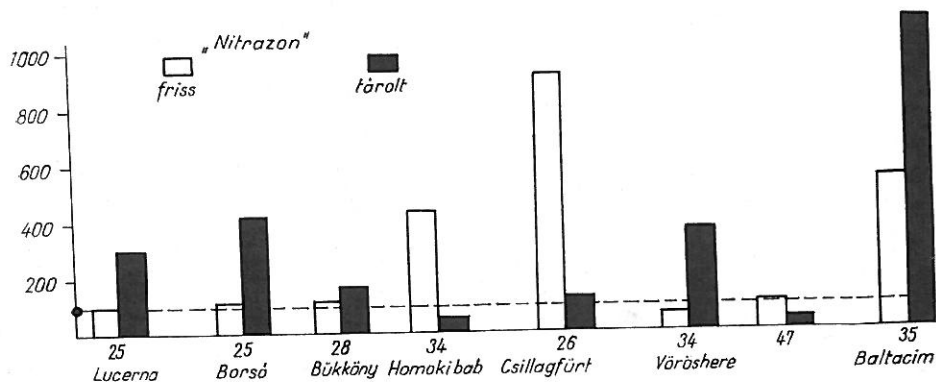
tási összehasonlító kísérletekben, rendkívül magas baktériumszám mellett, (majdnem 12 milliárd *Rhizobium meliloti* sejt 1 g-ban), megbízhatóan bebizonyosodott, hogy az ilyen „Nitrazon” sokkal hatékonyabb, mint a standardhoz közelálló (2 millió 1 g-ban). Csak két magas baktériumszámú „Nitrazon” minta esetében nem észleltünk statisztikailag megbízható hatáskülönbséget.

Az 1–2 évig tárolt „Nitrazon” hatékonyságának ellenőrzésekor lucernánál a szénatermesben nem volt megbízható különbség az egyenlő baktériumszámú friss és az 1–2 évig tárolt készítmények között. A borsónál ugyanezt tapasztaltuk a szemtermésnél a két évig tárolt és a friss preparátumok összehasonlításakor.

A külföldi és hazai preparátumok összehasonlítása céljából megvizsgáltuk a Szovjetunióból, Lengyelországból, Hollandiából, Nyugatnémetországból származó, továbbá a svéd, a svájci és amerikai készítményeket, amelyek előállítási módszerét és jellemzőit az irodalomból ismerjük. Minden készítményt a jótállási időn belül értékeltünk (9. és 10. ábra).

A legjobb minőségűnek bizonyult a „Veterrinaria” svájci cég lucernára készült gyártmánya. Az amerikai preparátum kitűnt nagy aktinomicéta és más idegen mikroorganizmus fertőzöttségének magas fokával, mivel a műanyagból készült, nem steril, lakkozott fóliával automatikusan csomagolták azokat. Három svéd készítményben a rhizobiumbaktériumok nagyon gyorsan eltűntek és a kísérlet megismétlésekor sem sikerült azokat fellelni.

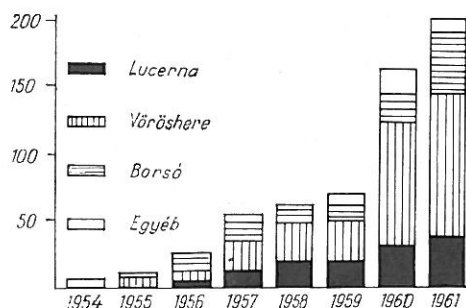
A fent bemutatott adatok arról tanuskodnak, hogy a „Nitrazon” magas rhizobiumbaktérium számú tiszta és hosszú ideig tárolható baktérium készítmény. Kutatásaink alapján a „Nitrazon” jótállási idejét 1959-ben felfeltűtük 6 hónapról egy évre, később két évre, amely lehetővé tette a készítmény előállításá-



8. ábra

A friss és a tárolt „Nitrazon” rhizobium baktérium-száma

ban, elosztásában és alkalmazásában mutatkozó sok nehézség kiküszöbölését. Nem szükséges ezek után szűk határidőre koncentrálni a termelést, a szezonjellegű termelésről áttérhetnek az üzemek a folyamatos évi termelésre, a lejárt garanciájú preparátumok alkalmazásának lehetősége — természetesen előzetes ellenőrzés után — évente jelentős megtakarítást jelent. Az 1957-es évtől, a kapott adatok alapján feleltük a „Nitrazon”-nal szembeni mi-



9. ábra

A „Nitrazon”-készítmény termelése a Csehszlovák Szocialista Köztársaságban az 1954—1961 években (1000 üveg)

nőségi követelményeket a legújabb szovjet standardoknak megfelelően.

Megfigyeléseink rámutatnak arra, hogy egyéb tényezőkön kívül a pillangós baktérium oltóanyag minőségét a hordozó anyag tulajdonságai szabják meg, mindenképp annak sterilítása, továbbá a tenyésztés, oltás és adagolás módjai, valamint a megfelelő csomagolás.

A talajoltás maximális hatékonyságának érdekében nagy figyelmet fordítottunk a rhizobium-baktérium üzemi törzseinek kiválasztására. A módszereket, amelyekkel a rhizobium-baktérium és a gazdanövény szimbiózisá-

nak hatékonyságát igyekeztünk emelni, több közleményben ismertettük [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Ezek a baktériumok növényen keresztül irányított passzázsának módszerei, a baktériumok egyes, az oltásra kevésbé érzékeny növényekhez való alkalmazkodása, továbbá egyfajta rhizobium-baktérium polivalens kultúrákkal való oltási módszere, a szimbiózis hatékonyságának szabályozása a gazdanövény tápanyagellátásának változtatásával és az antibiotikumok alkalmazása.

Ezeknek a munkáknak eredményeképpen közel 800 rhizobium-törzsből kiválasztottunk 47 törzset, amelyek maximálisan növelték a növények terméseit a 9 pillangós növényen végzett szabadföldi összehasonlító kísérletekben. Ezeket a törzseket át is adtuk a baktérium oltóanyag gyárnak a „Nitrazon” készítmények gyártása céljából.

A „Nitrazon” oltóanyag hatékonysága a mi viszonyaink között kielégítő: a lucerna és vöröshere szénatermésének növekedése az összehasonlító kísérletekben elérte a 310%-ot, foszfor és káliumtrágyázás mellett semleges talajokon a termés 41%-kal nőtt, alacsonyabb pH-jú talajokon kalcium, foszfor és kálium alkalmazásával a zöldtömeg 52%-kal emelkedett, a magterméstöbbség pedig 69% volt. Majdnem minden esetben növekedett a növények szárazanyagának fehérjetartalma is.

Borsónál az összehasonlító kísérletekben a szemterméstöbbség a baktériumoltás hatására — 22,2 q/ha kontrolltermés mellett — maximálisan 14,8%-ot. A szója termése a talajoltás következtében 58%-kal növekedett.

85 baktériumoltási kísérlet átlagadatai szerint a baktérium-készítmények a növények széna-, vagy szemtermését 15%-kal növelik.

Mivel ezeket az eredményeket nálunk az egyes növények szokásos termelési körülmények között nyertük, a „Nitrazon” hatékonyságának bizonyítékul fogadhatjuk el azokat.

A gazdaságossági számítások azt mutatják, hogy az 1 ha-ra szükséges magmennyiség oltá-



10. ábra

Pillangós növényekre készült baktérium oltóanyagok: holland, nyugatnémet és lengyel



11. ábra

Pillangós növényekre készült baktérium oltóanyagok: magyar, lengyel, amerikai, svájci, svéd és cseh

sára fordított költség 38.43 korona, míg a baktériumoltásból eredő bevétel 416, sőt több mint 3100 korona ha-ként.

Befejezésül meg kell említeni, hogy Csehszlovákiában a pillangós növények számára készített baktérium-preparátumok gyártása a prágai Növénytermesztési Intézet által szállított rhizóbium-baktérium törzseken alapszik. A fent leírt módszerrel hazánkban az 1955—1963 években több mint egy millió üveg „Nitrazon” készült.

A készítmény napi termelése a fent leírt előállítási módszer alkalmazásával az 1955/1956 évi 645 üvegről 1962. évben 3500 üvegre növekedett. Ez a módszer lehetővé teszi továbbá a jelenlegi berendezések mellett is az évi 500 000 üveg legyártását.

Kutatási eredményeink alkalmazásának következtében a készítmények önköltsége az 1957—1960-as években 36,8%-kal csökkent.

A készítmény huzamosabb ideig való tárolhatósága lehetővé teszi a szezonjellegű termelés helyett a folyamatos termelés bevezetését, ami tovább csökkenti az önköltséget.

A „Nitrazon” hatékonyságának következtében állandóan terjed a mezőgazdasági gyakorlatban való alkalmazása, amely már jelenleg Csehszlovákiában a pillangós növények területének kb. 28%-án valósult meg (9. ábra).

A baktérium oltóanyag-üzemmel való együttműködésünk kezdetén a „Nitrazon” évi termelése mindössze 5000 üveg volt, míg az együttműködést követő hat év alatt több mint 42-szeresére növekedett (évi 5000 üvegről 211 000 üvegre). Ily módon a pillangós növények baktériumoltása — Csehszlovákiában — szükségszerűen alkalmazandó agrotechnikai intézkedéssé vált.

HAMATOVÁ—HLAVÁČKOVÁ E.

Érkezett: 1963. november 1.

Irodalom

- [1] BERJOZOVA, J. F.: Szucsosozt dejsztvija bakterialnüh udobrenij. Szovescsanije po bakt. udobrenijam. Leningrád. 17—22. VIII. 1962.
- [2] DOROSINSKIJ, L. M.: Proizvodstvo, primenije i effektivnoszt bakterialnüh udobrenij v SSSR. Szovescsanije po bakt. udobrenijam. Leningrád. 17—22. VIII. 1962.
- [3] HAMATOVÁ, E.: Vliv penicilinu na symbiózu rhizobií s motýlokvetými rostlinami. Sb. ČSAZV Rostlinná výroba. **33**. 71—90. 1960.
- [4] HAMATOVÁ, E.: Vliv mikrocidu na rhizobia v čistých kulturách a v symbióze s rostlinami. Věd. Čas. Rostlinná výroba. **35**. 811—824. 1962.
- [5] HAMATOVÁ, E.: Výzkum využití speciálních bakterií pro zvyšování vynosů zemědělských plodin: hlízkové bakterie. Záv. zpráva o úkolu 05 01. ÚVÚRV. Praha. 1962.
- [6] HAMATOVÁ, E.: Specifita Rh. japonicum vůči různým odrudám sóji. Věd. čas. Rostlinná výroba. **36**. 728—731. 1963.
- [7] HLAVÁČKOVÁ, E.: Azotofiksizirujuscsaja aktivnoszt klubnikovüh bakterij lucerni v klubnikah po fazam razvitija rastenija i godam ego zszini. Kandidátusi értekezés. Moszkva. 1954.
- [8] HLAVÁČKOVÁ, E.: Příprava a používání bakteriálních očkovacích látek v zemědělství. Sb. ČSAZV Rostlinná výroba. **29**. 909—936. 1956.
- [9] HLAVÁČKOVÁ, E. ET AL.: Některé faktory, ovlivňující účinnost mikrobiálních očkovacích látek. Vědecké práce ÚRV. **3**. 166—184. 1957.
- [10] JUROSZEK, J.: Produkcja polskiej Nitraginy. Konferencja Rhizobium i jego współżycie s roślinami. Pulawy. 26—27. XI. 1962.
- [11] KÁŠ, V.: K vývojovému cyklu hlízkových bakterií. Sb. ČAZ. **2**. 673—692. 1927.
- [12] KÁŠ, V.: K otázce příbuznosti hlízkových bakterií (infekční typ u hlízek sóje). Věstník ČSAZ. **6**. 1073—1078. 1930.
- [13] LEHNER, A.: Hat die Impfung der Leguminosen heute noch einen Zweck? Prakt. Blätter f. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz. München. 1956.
- [14] ROMÁN, J.: A rhizóbium-talajoltóanyagok használata és üzemi termelésének problémái. Agrártudomány. **11**. 575—579. 1951.
- [15] STOKLASA, J.: Studien über die Assimilation elementaren Stickstoffs durch die Pflanzen. Landw. Jahrbücher. **24**. 827—863. 1895.
- [16] STOKLASA, J.: Der gegenwärtige Stand der Nitraginfrage. Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Österr. **1**. 1—12. 1898.
- [17] VAN SCHREVEN, D. A.: Experiments on the cultivation of Rhizobium in liquid media for use on the Zuiderzee polders. Ant. van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. **19**. 300—308. 1953.
- [18] VAN SCHREVEN, D. A.: On the production of legume inoculants in a mixture on peat and soil. Ant. van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. **20**. 33—57. 1954.
- [19] VINCENT, J. M.: The control of the quality of legume seed inoculants. J. Austr. Inst. Agric. Sci. 247—249. 1954.
- [20] WATERS, L. M.: Tests of commercial peat inoculants. J. Austr. Inst. Agric. Sci. 250—251. 1954.
- [21] WIKÉN, T.: Möglichkeiten der Produktionssteigerung in der schweizerischen Landwirtschaft durch neuzeitliche bakterielle Impfverfahren. Schw. Landw. Monatshefte. **34**. 3—31. 1956.
- [22] WRÓBEL, T.: Wytrob szczepionek i wyniki szczepienia nimi roślin motylkowych. Acta Microbiol. Polon. **8**. 321—332. 1959.